اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر *کلایورومایسس مارکسیانوس* و خواص حسی در دوغ ایرانی

سحر اقدسی[a]، حامی کابوسی[b]*، لیلا گلستان[c]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه صنایع غذایی، واحد آیت اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
[b] استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد آیت اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
[c] استادیار گروه صنایع غذایی، واحد آیت اله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۹/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۱/۹

چکیده

مقدمه: گیاه اوجی (*Mentha aquatica*) یکی از گونه‌های خانواده نعنائیان می‌باشد. اسانس این گیاه بر روی انواع میکروب‌ها در محیط کشت خواص ضد میکروبی موثری را نشان داده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های اوجی بر قابلیت بقای کلایوورومایسس مارکسیانوس در دوغ ایرانی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: اسانس اوجی با روش تقطیر با آب با دستگاه کلونجر استخراج گردید. ترکیبات مؤثر این اسانس با دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی(GC/MS) شناسایی شد. خاصیت بازدارندگی اسانس اوجی بر روی مخمر *کلایوورومایسس مارکسیانوس* در محیط کشت مولر هینتون آگار و با روش دیسک دیفیوژن مورد آزمایش قرار گرفت و بعد از اطمینان از خاصیت ضدمیکروبی آن، اثر بازدارندگی اسانس اوجی در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ درصد بر کلایوورومایسس مارکسیانوس در دوغ ایرانی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و طی یک دوره ۲۸ روزه انبارمانی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که اسانس اوجی در غلظت‌های بالاتر دارای بالاترین اثر بازدارندگی بر روی رشد کلایوورومایسس مارکسیانوس می باشد. در مورد اثر توام اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی و اثر ضد میکروبی می توان گفت، غلظت بهینه ای که باعث ایجاد طعم مطبوع شد غلظت ۰/۱ درصد اسانس بود که این غلظت در دمای ۴ درجه باعث کاهش معناداری ($P< ۰/۰۵$) در تعداد مخمر تلقیحی نیز گردید.

نتیجه‌گیری: اسانس اوجی بسته به غلظت‌های مورد استفاده باعث کاهش در قابلیت بقای میکروارگانیسم مورد آزمایش شد.

واژه‌های کلیدی: *اثر بازدارندگی، اسانس، اوجی، دوغ ایرانی، کلایوورومایسس مارکسیانوس*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: hkaboosi@gmail.com

مقدمه

استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی یکی از روش‌های رایج در کنترل میکروبی مواد غذایی محسوب می‌شود (Najafpour Navaei, 1979). با این وجود امروزه بر کاهش استفاده از این روش‌ها تاکید می‌شود، زیرا از یک سو مصرف کنندگان مواد غذایی خواستار غذاهای طبیعی با ماندگاری طولانی، همراه با کمترین تغییر در ساختار آن می‌باشند و از سوی دیگر خاصیت سرطان‌زایی و سمی بودن برخی از نگهدارنده های شیمیایی نیز برای انسان به اثبات رسیده است. از این رو فشار بر روی صنایع غذایی برای جایگزینی سریع نگهدارنده‌های شیمیایی و استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی یکی از رویکردهای جدید در جهت ارتقای سلامت میکروبی غذاها و به دنبال آن افزایش سطح سلامت عمومی جوامع می‌باشد (Youzbashi, 1380). اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل دهنده آن‌ها یکی از این نگهدارنده‌های طبیعی می‌باشند که اثرات ضد میکروبی آن‌ها سال ها است که کاملا شناخته شده است.

یکی از این نگهدارنده‌های طبیعی اسانس نعناع است و تاکنون مطالعات بسیار گسترده‌ای در مورد اثرهای درمانی گونه‌های مختلف نعناع صورت گرفته که برخی از آن‌ها نیز در گذشته شناخته شده بوده و در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفت. در تحقیقات دو دهه اخیر اثر نعناع بر بسیاری از بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا مانند ویروس‌ها، قارچ‌ها و اثرات ضد باکتریایی آن مورد بررسی علمی قرار گرفته است (Tajkarimi *et al*., 2010).

خانواده نعنائیان تیره بزرگی از گیاهان گلدار است و طبق بررسی‌های جدید در این تیره ۴۰۰۰ گونه در ۲۰۰ جنس جای داده شده است که معمولاً دارای اسانس هستند. این گیاهان در اغلب نواحی کره زمین پراکندگی دارند ولی بیشترین انتشار آن‌ها در منطقه مدیترانه است و گیاهان معروفی چون نعناع، اسطو خدوس، بادرنجبویه، پونه، مریم گلی، آویشن، مرزه، ریحان، مرزنجوش در این خانواده قرار دارند (زرگری، ۱۳۷۶). جنس نعناع، بیش از ۳۰–۲۵ گونه است که در سراسر مناطق معتدل جهان به‌طور گسترده‌ای رشد می‌کند (Gulluce *et al*., 2007). یکی از این گونه‌ها، گونه *منتا آکواتیکا*[1] از گیاهان آروماتیک با نام محلی اوجی و نام فارسی سوسنمبر و پونه آبی است که اسانس آن خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی دارد. اسانس گونه‌های نعناع به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی در سراسر جهان بکار برده می‌شود (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷؛ Kizil *et al*., 2010).

اضافه کردن اسانس‌ها به مواد غذایی هم از جهت نگهداری و هم تنوع در طعم اثر بخش بوده و مطالعات زیادی در این جهت صورت گرفته است (زرگری، ۱۳۷۶؛ Tajkarimi *et al*., 2010).

دوغ یک فراورده لبنی تخمیری است که حاصل از تخمیر لاکتیکی شیر می‌باشد و از اختلاط ماست با آب آشامیدنی، نمک و همچنین افزودن اسانس سبزیجات تهیه می‌شود. از خواص تغذیه‌ای دوغ می‌توان به افزایش ویتامین‌ها و متابولیت‌های مغذی، بهبود جذب کلسیم و قابلیت هضم بیشتر نسبت به شیر اولیه اشاره کرد. دوغ حاوی کلسیم و سایر مواد معدنی و ویتامین‌های موجود در ماست، پروتئین و چربی است از این رو می‌تواند تأمین کننده یک چهارم نیاز روزانه بدن به کلسیم و حاوی ویتامین‌های B2 و B6 و B12 و قوی کننده استخوان‌ها باشد. در دهه اخیر در راستای سیاست های تغذیه‌ای دولت مبنی بر جایگزینی دوغ بجای نوشابه های گازدار صنعتی، تولید صنعتی دوغ رواج یافته و تا حد زیادی با استقبال مردم روبرو شده است تا آنجا که طبق آمار منتشره کلایورومایسسس از سوی دفتر آمار و فن آوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی میزان تولید دوغ در ایران در سال‌های اخیر روند افزایشی داشته است (وثوق و همکاران، ۱۳۸۸).

از نظر میکروبیولوژی می‌توان گفت که دوغ حاوی همان میکروارگانیسم‌هایی است که در ماست وجود دارند ولی میزان این میکروارگانیسم‌ها در دوغ کمتر است. با توجه به pH پایین دوغ(۴/۵) این فرآورده محیط مناسبی جهت رشد و فعالیت مخمرها می‌باشد و بسیاری از مخمرها در حضور غلظت بالایی از مواد حل شونده نظیر نمک می‌توانند به خوبی رشد کنند (بنیادیان وکریم، ۱۳۸۱).

مخمری مانند *کلایورومایسس مارکسیانوس*[2] می‌تواند در دوغ فعالیت نموده و علاوه بر تغییر عطر و طعم باعث

[1] *Mentha aquatica L.*

[2] *Kluyveromyces marxianua*

تولید گاز در دوغ شود. *کلایورومایسس مارکسیانوس* از مخمرهای متداول در فراورده‌های لبنی است و یکی از عوامل آلوده کننده و مولد فساد در برخی از مواد غذایی از جمله ماست و فراورده‌های وابسته به آن مانند نوشیدنی دوغ در ایران می‌باشد (خدائیان چگنی، ۱۳۷۸).

این پژوهش با هدف بررسی اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر قابلیت بقای *کلایورومایسس مارکسیانوس* در دوغ ایرانی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

- تهیه سوسپانسیون میکروبی

سویه‌های استاندارد میکروبی، *کلایورومایسس مارکسیانوس* (PTCC ۵۱۹۳)، از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران بصورت لیوفیلیزه تهیه شد.

آمپول حاوی مخمر موردنظر با احتیاط کامل در کنار شعله تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینار شکسته شد. برای فعال کردن میکروارگانیسم، محتویات سویه میکروبی را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Malt Extract Agar(biomark) که استریل شده بود، انتقال داده شد. و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. از مخمر مورد نظر در محیط کشت Malt Extract broth کشت اسلنت تهیه شد و در فریزر (دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد و در مواقع مورد نیاز از آن بر روی محیط‌کشت Malt Extract Agar تجدید کشت گردید (کریمی، ۱۳۸۷؛ روحانی، ۱۳۹۲).

- جمع‌آوری و نگهداری گیاه اوجی

گونه نعناع با نام محلی اوجی در آذر و دی ماه سال ۱۳۹۲ از مزارع و باغات شهرستان آمل واقع در استان مازندران تهیه گردید و سپس توسط کارشناسان علمی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آیت اله آملی مورد تأیید قرار گرفت. گیاهان ابتدا شسته و سپس تحت شرایط مناسب در سایه خشک گردید، بطوریکه نور مستقیم خورشید به آن نتابد و از طرفی هوای اتاق هم در جریان باشد تا دمای اتاق زیاد بالا نباشد و پس از خشک شدن، جهت تهیه اسانس، برگ‌ها با آسیاب برقی (مدل Depose-Brevete SGDG، ساخت شرکت Moulinex). خرد شدند.

- تهیه اسانس

نمونه برگ‌های آسیاب شده در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آیت اله آملی مورد اسانس گیری قرار گرفت. عمل اسانس‌گیری توسط دستگاه کلونجر طرح میکوئل[1] انجام شد.در هر دور اسانس‌گیری حدود ۱۰۰ گرم برگ خشک آسیاب شده با حدود ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (تقریبا معادل یک سوم حجم بالن) داخل بالن ژوژه مخلوط شدند تا عمل اسانس‌گیری روی آن انجام گردید. بدین صورت که ابتدا دمای هیتر را روی حدودا ۳۰۰-۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم کرده و به محض جوشیدن محتویات داخل بالن، دما را روی ۱۰۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم کرده و برای مدت ۴-۳ ساعت عمل اسانس‌گیری انجام شد. سپس اسانس تقطیر شده را درون شیشه‌های کوچک تیره جمع‌آوری کرده و تا زمان مصرف در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری گردید.

- آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس گیاه مورد مطالعه با همکاری مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله آملی شناسایی شدند. اسانس مورد نظر پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) تزریق گردیدند تا نوع ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Agilent مدل 7890A با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۱۵ میکرولیتر از نوع DB-35MS بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید: دمای اولیه آون ۳۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما برای مدت ۵ دقیقه، گرادیان دمایی ۷ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دمای تا ۲۴۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵ درجه در دقیقه، افزایش دما تا ۲۷۰ درجه سانتی گراد و ۳ دقیقه توقف در این دما، دمای اتاقک تزریق ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان[2] ۰/۷ میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف نگار جرمی مورد استفاده از نوع Agilent مدل 5975C با ولتاژ

[1] Miquel [2] Flow

یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت.

- روش بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس اوجی بر مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در غلظت‌های مختلف به روش دیسک- دیفیوژن

فعالیت ضد میکروبی اسانس انتخاب شده توسط روش دیسک دیفیوژن بر طبق دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه کلینیکی (NCCLS1977) تعیین شد (Stevens *et al.*, 2011).

برای تعیین حساسیت مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* نسبت به اسانس و بررسی قطر هاله عدم رشد اسانس بر روی این مخمر، از روش دیسک دیفیوژن استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا از سویه میکروبی مورد نظر سوسپانسیون میکربی معادل ۰/۵ مک فارلند (cfu/ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$) تهیه شد، و از سویه مورد نظر به میزان ۰/۱ میلی لیتر توسط پیپت استریل بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار[1] بصورت یکنواخت کشت داده شد.

آنگاه دیسک‌های بلانک استریل با قطر ۶ میلی‌متر، در اسانس خالص اوجی و غلظت‌های مختلف تهیه شده از اسانس این گیاه (۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴) غوطه‌ور گردید، جهت رقیق‌سازی اسانس نیز از حلال پروپیلن گلایکول استفاده شد.

دیسک‌های تهیه شده از مقادیر مختلف اسانس در کنار شعله و توسط لوپ استریل با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت بر روی سطح محیط کشت مولر هینتون اگار قرار داده شدند. و سپس پلیت های مورد نظر به مدت ۵-۳ روز در انکوباتور تحت دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. و سپس با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد (میلی متر) در اطراف دیسک‌ها نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

دیسک کاغذی پروپیلن گلایکول در تمام نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت و تأثیر ضدمیکروبی نداشت (Nychas *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2011).

- روش بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس اوجی بر روی مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ ایرانی

برای آماده سازی تیمارهای دوغ، ماست تازه بسته‌بندی شده از کارخانه هراز (آمل) خریداری شد و بعد از اطمینان از عدم وجود مخمر در آن (کشت جهت وجود مخمر)، در شرایط کاملاً سترون، ماست در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری سترون شده به نسبت ۵۰ به ۵۰ با آب جوشیده سرد شده مخلوط گردید (دوغ تولید شده دارای pH=۴/۲۱ در دمای محیط بود). همچنین به تمامی ظرف‌های دوغ تهیه شده به میزان ۰/۵ درصد نمک در شرایط سترون اضافه شد. در ادامه از اسانس استاندارد اوجی، حجم مورد نیاز برای ایجاد غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵ درصد اسانس اوجی به ظرف‌های دوغ تیمار اضافه گردید (روحانی، ۱۳۹۲؛ فدائی و همکاران، ۱۳۸۳؛ بی‌نام، ۱۳۸۹).

با استفاده از استاندارد ۰/۵ مک فارلند (cfu/ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$) سوسپانسیونی از مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* تهیه نموده و سپس به همه ظرف‌های دوغ تیمار و شاهد (دوغ بدون اسانس)، از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده تلقیح گردید بطوریکه میزان مخمر در دوغ بیش از cfu/ml ۳×۱۰^{۶} بود. در ادامه همه ظرف‌های تیمار و شاهد در دماهای ۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲۸ روز گرمخانه‌گذاری شدند (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷؛ Smith-Palmer *et al.*, 2001).

تمام آزمون‌ها برای بررسی تغییر تعداد مخمر تلقیح شده در نمونه شاهد (دوغ بدون اسانس) حاوی سوسپانسیون میکروبی همانند نمونه‌های دوغ حاوی اسانس و سوسپانسیون میکروبی صورت گرفت.

روند تغییرات تعداد مخمر تلقیح شده در روزهای صفر، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مورد بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه، یک میلی لیتر از دوغ در شرایط سترون برداشت شد و با ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون مخلوط شد و در شیکر همزده شد و سپس توسط سرم فیزیولوژی تا رقت مناسب، رقیق گردید، سپس از رقت‌های مناسب تهیه شده به میزان ۰/۱ میلی لیتر (۱۰۰ میکرو لیتر) به سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار[2] منتقل گردید و بصورت

[1] Muller Hinton Agar

[2] Sabouraud Dextrose Agar

سطحی[1] کشت داده شد، سپس محیط‌های کشت داده شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از گذشت این مدت، تعداد پرگنه‌های میکروارگانیسم شمارش شدند (بی‌نام، ۱۳۷۰) و نتایج (میانگین ۳ تکرار) بصورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی[2] در هر میلی لیتر از نمونه گزارش شد (مشتاقی و بنیادیان، ۱۳۸۷).

- ارزیابی حسی

جهت ارزیابی اثراسانس‌ها بر صفات ارگانولپتیک نمونه‌های دوغ (شامل عطر (بو)، طعم و پذیرش کلی)، دوغ‌های حاوی اسانس اوجی همراه با یک نمونه شاهد بعد از درست کردن دوغ در شرایط یکسان با استفاده از آزمون هدونیک ۵ امتیازی (۱بسیار بد تا ۵ بسیار عالی) توسط ۱۰ نفر پانلیست نیمه آموزش دیده انجام گرفت.

- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، تیمارها در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفته و نتایج بدست آمده با استفاده از روش های آنالیز واریانس یکطرفه (One- Way – ANOVA) و آنالیز واریانس تک متغیره GLM Univariate در سطح احتمال (P<۰/۰۵) مورد بررسی قرار گرفته و همچنین مقایسه میانگین ها با استفاده از روش آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال (P<۰/۰۵) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته است. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS V.16 انجام گرفته و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل رسم گردیده است.

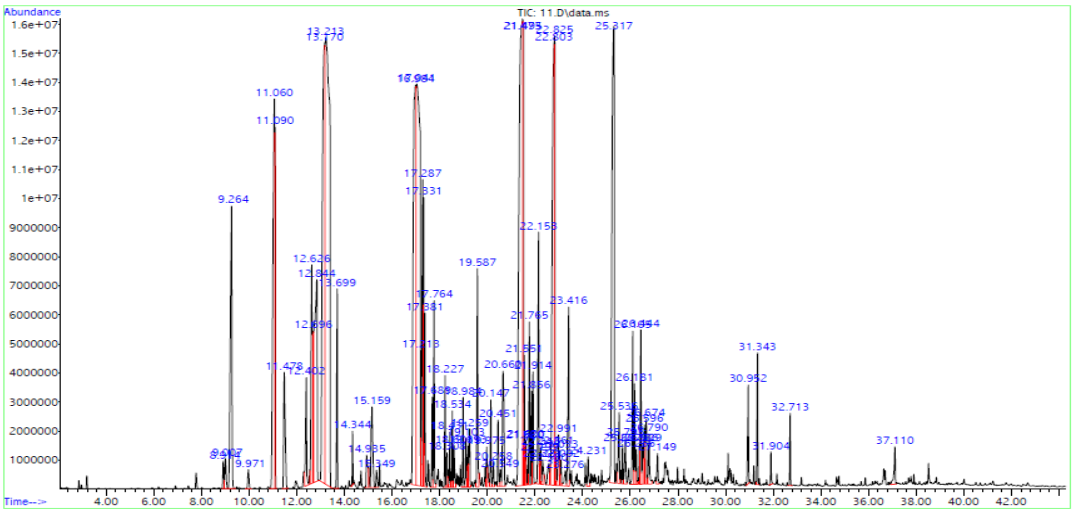
یافته‌ها

- ترکیبات تشکیل دهنده اسانس اوجی

جدول ۱ (بترتیب از بالا به پایین) بالاترین میزان ترکیبات شناخته شده در گیاه اوجی را بر اساس GC-MS نشان می‌دهد همانطور که مشاهده می‌شود ترکیب ۱و ۸-سینئول[3] اصلی ترین ترکیب شناخته شده در گیاه اوجی می‌باشد.

- اثر ضدمیکروبی اسانس گیاه اوجی بر مخمر کلایوروماییسس مارکسیانوس در غلظت‌های مختلف به روش دیسک دیفیوژن

نتایج آنالیز واریانس داده‌های حاصل از بررسی اثر تیمارهای مختلف اسانس اوجی و کنترل (پروپیلن گلایکول) بر روی مهار رشد مخمر *کلایوروماییسس مارکسیانوس* در نمودار ۱ نشان می‌دهد که تیمارهای ۱/۴ تا ۱/۱۶ و همچنین ۱/۳۲ ، ۱/۶۴ و کنترل فاقد اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر بوده‌اند. درحالیکه دیگر تیمارها دارای اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر و تیمار کنترل می‌باشند. لذا می توان گفت که تیمارهای اسانس خالص و کنترل دارای بیشترین و کمترین میانگین قطر هاله عدم رشد بترتیب بوده اند (P<۰/۰۵).

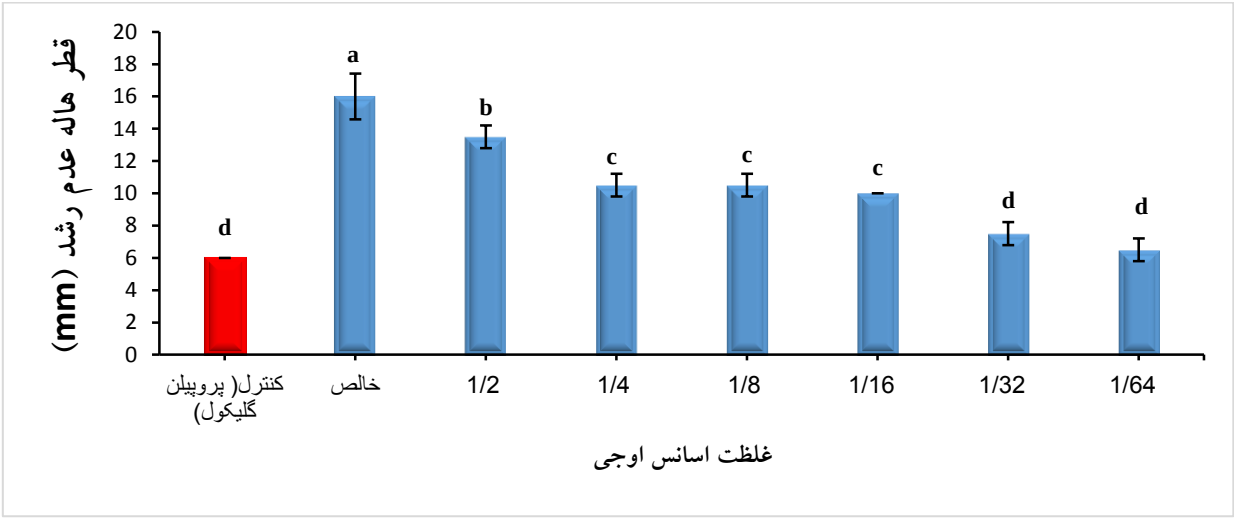


شکل ۱ –کروماتوگرام اسانس گیاه اوجی به دست آمده از دستگاه GC-MS

[1] Surface Plating [2] Colony Forming Units (CFU) [3] 1,8-Cineole

جدول ۱- بالاترین میزان ترکیبات شیمیایی شناخته شده در اسانس گیاه اوجی

اندیس کواتز(KI)	درصد	ترکیبات	زمان بازداری (دقیقه)
۱۰۳۱	۱۷/۹۲۹	۱،۸ –سینئول	۱۳/۱۴۵–۱۳/ ۲۱۵
۱۱۶۳	۱۵/ ۱۶۱	منتوفوران	۱۶/۹۸۶–۱۷/۰۴۰
۱۵۸۰	۱۱/۸۲۱	کاریوفیلین	۲۱/۴۷۵–۲۱/۴۹۶
۱۵۰۰	۶/۶۳۴	دی–جرماکرین	۲۲/۸۰۳–۲۲/۸۲۵
۱۵۹۰	۶/۲۵۷	وی ری دی فلورول	۲۵/۳۱۵
۱۰۲۹	۵/۷۹	دی–لیمونین	۱۲/۶۲۶–۱۲/۸۴۲
۹۸۰	۵/۲۶۲	بتا پینن	۱۱/۰۶۰–۱۱/۰۹۲
۹۳۹	۲/۷۲۴	آلفا پینن	۱۹/۲۶۶
۱۵۱۴	۲/۲۵۵	آلفا کادینول	۲۶/۱۰۴–۲۶/۴۴۴
۱۱۸۱	۱/۸۵۵	ترپینن–۴–ال	۱۷/۲۸۷
۱۴۵۴	۱/۳۲۱	آلفا کاریوفیلین	۲۲/۱۵۵



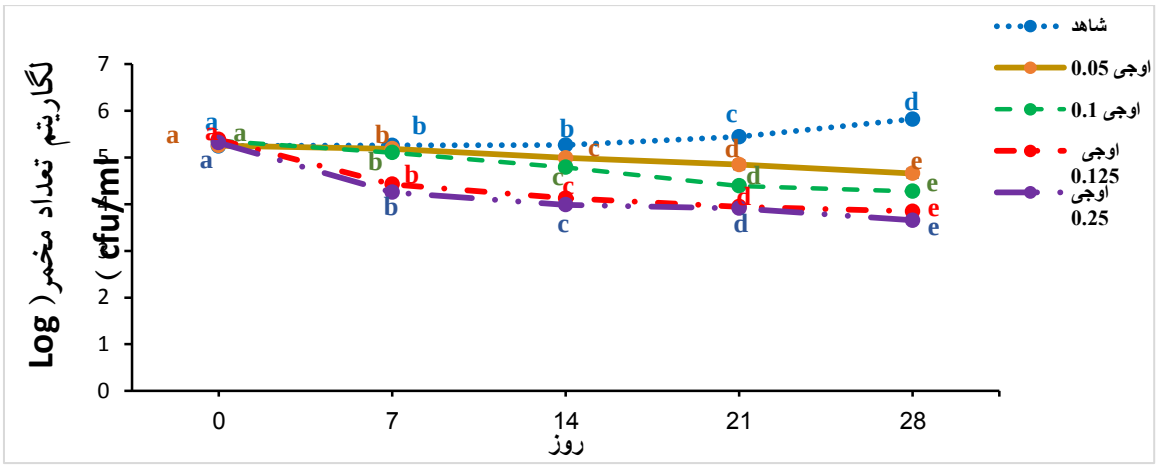
نمودار ۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* در حضور غلظت های مختلف اسانس اوجی و کنترل (پروپیلن گلیکول) به روش دیسک دیفیوژن (P< ۰/۰۵)

- اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس اوجی بر روی مخمر کلایورومایسس مارکسیانوس در دوغ

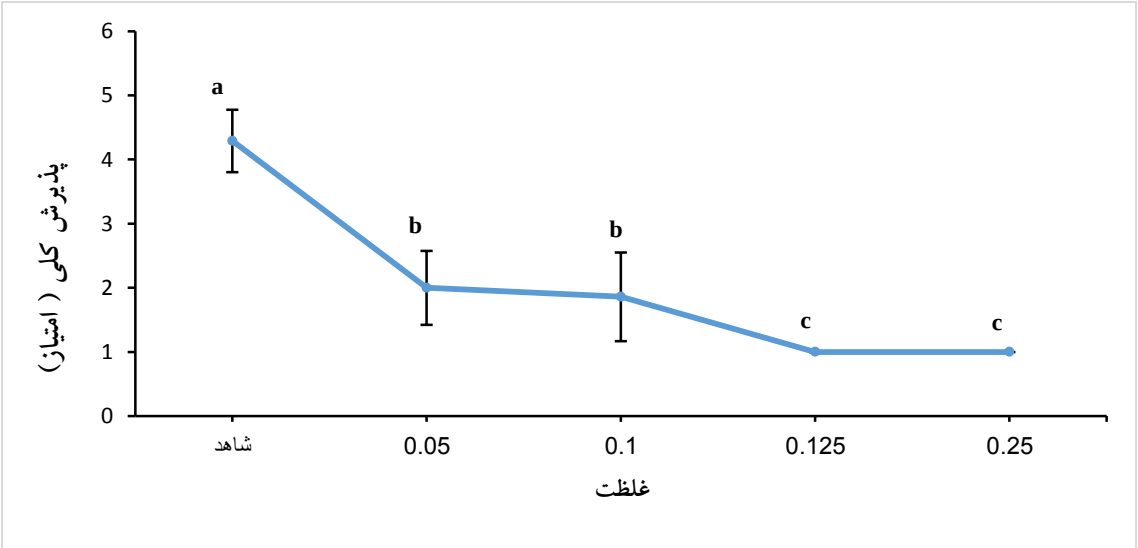
آنالیز واریانس داده‌های حاصل از بررسی اثر بازدارندگی تیمارهای مختلف اسانس اوجی و مقایسه آن با تیمار شاهد در مدت زمان ۲۸ روز بر روی رشد مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* در نمودار ۲ نشان می‌دهد که لگاریتم تعداد مخمر تلقیحی در تمامی تیمارها برخلاف شاهد با گذشت زمان روند کاهشی داشته است و بین روزهای مختلف اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشته است، در تمامی تیمارها روزهای ۰ و ۲۸ از بیشترین و کمترین میزان مخمر بترتیب برخوردار بوده اند. تیمار ۰/۲۵ درصد اسانس اوجی دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بوده است (P<۰/۰۵).

- پذیرش کلی اسانس اوجی

نتایج آنالیز واریانس حاصل از ارزیابی حسی میانگین امتیاز پذیرش کلی دوغ ایرانی حاوی تیمارهای مختلف اسانس اوجی در نمودار ۳ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اسانس امتیاز پذیرش کلی کاهش یافته یافته است. در اسانس اوجی تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۱ و همچنین ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ فاقد اختلاف آماری معنی داری بوده اند. تیمار شاهد و ۰/۲۵ اسانس اوجی از بیشترین و کمترین امتیاز پذیرش کلی بترتیب برخوردار بوده‌اند (P<۰/۰۵).



نمودار۲- مقایسه روند تغییرات میانگین لگاریتم تعداد مخمر *کلایوروما یسس مارکسیانوس* تلقیح شده به دوغ در تیمارهای مختلف اسانس اوجی در مدت زمان ۲۸ روز (P< ۰/۰۵)



نمودار۳- مقایسه میانگین امتیاز پذیرش کلی در تیمارهای مختلف دوغ حاوی اسانس اوجی (P< ۰/۰۵)

بحث

نتایج بدست آمده از آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس اوجی توسط دستگاه GC-MS نشان داد که اصلی ترین ترکیب در گیاه *منتا آکواتیکا* ۸،۱-سینؤل بود.

در برخی از مقالات اشاره شده است که ترکیب شیمیایی منتوفوران اصلی ترین ترکیب اسانس گیاه *منتا آکواتیکا* است (Singh *et al*., 2011) و این ترکیب یک اتر است و خاصیت ضد میکروبی دارد (Bakkali *et al*., 2005; Tassou, 1995). و در برخی از مقالات دیگر اشاره شده که ترکیب شیمیایی ۸،۱- سینؤل اصلی‌ترین ترکیب اسانس گیاه *منتا آکواتیکا* است (Tyagi & Malik, 2011).

در حالی که در مطالعه ما این دو ترکیب (منتوفوران و ۸،۱-سینؤل) دارای نسبت تقریبا مساوی با یکدیگر بودند. ولی ترکیب شیمیایی ۸،۱- سینؤل از درصد نسبتا بالاتری برخوردار بود.

نتایج بدست آمده در بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های گیاه اوجی علیه مخمر *کلایوروما یسس مارکسیانوس* به روش دیسک دیفیوژن در محیط کشت نشان داد که اسانس گیاه اوجی در محیط‌کشت حاوی مخمر *کلایوروما یسس مارکسیانوس* هاله شفاف ایجاد می‌نماید و دارای اثر بازدارنده رشد بر روی این مخمر می‌باشد.

همانطور که مشاهده شد غلظت خالص دارای بالاترین قطر هاله عدم رشد است و با کمتر شدن غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد کمتر می‌شود. عمل ضد میکروبی اسانس تحت تأثیر فاکتورهایی مثل توانایی ترکیب شیمیایی ضد باکتریایی برای نفوذ کاملاً یکنواخت در آگار، حجم اسانس روی دیسک‌ها یا ضخامت لایه آگار می‌تواند شدیداً متغیر باشد (وثوق و همکاران، ۱۳۸۸).

در این تحقیق قطر هاله عدم رشد غلظت‌های خالص اسانس اوجی در محیط‌کشت حاوی مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* ۱۶ بود.

در بررسی انجام شده توسط برخی محققین قطر هاله عدم رشد اسانس *منتا اسپیکاتا* و *منتا پیپریتا* بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923، به ترتیب ۱۶ میلی‌متر و ۱۵ میلی متر بوده است (Kizil *et al*., 2010).

در تحقیق *Sokovic* و همکاران در سال۲۰۰۹ قطر هاله عدم رشد اسانس *منتا اسپیکاتا*، *منتا پیپریتا*، مرزنجوش، آویشن، ریحان و مریم گلی بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* 25923، به ترتیب ۲۲، ۲۰، ۳۲، ۲۸، ۱۸ و ۱۲ میلی‌متر بوده است.

در تحقیق دیگری قطر هاله عدم رشد اسانس برگ‌های *منتا اسپیکاتا*، *منتا آرونسیس*، *منتا پیپریتا* و *منتا لونگیفولیا* که در فصل تابستان و زمستان برداشت شده بر روی *آسپیرژیلوس فلاووس* ATCC 32612، به ترتیب ۲۶-۲۹، ۲۱-۲۵، ۲۲-۲۰، ۲۹-۳۰ میلی متر گزارش شده است و این اسانس‌ها خواص ضدمیکروبی فوق العاده‌ای بر روی میکروارگانیسم مورد مطالعه داشتند (Hussain *et al*., 2010).

نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارندگی اسانس اوجی بر مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* در دوغ ایرانی در این تحقیق نشان داد که اسانس اوجی فعالیت ضدمیکروبی قابل توجهی بر روی مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* در دوغ دارا می‌باشد و با افزایش غلظت اسانس، لگاریتم تعداد مخمر کاهش یافت.

بنیادیان و کریم در سال ۱۳۸۱ تأثیر روغن‌های فرار گیاهان پونه، ترخان، آویشن، نعناع بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط‌کشت مایع بررسی کردند. بر اساس نتایج بدست امده روغن‌های فرار گیاهان اثر ضدمیکروبی قابل قبولی از خود نشان دادند، بنابراین امکان اینکه بتوان از آنها به عنوان یک نگهدارنده و یک طعم دهنده طبیعی در مواد غذایی استفاده کرد وجود دارد.

همچنین نتایج حاصل از این تحقیق با مطالعه *Agboola* و *Tesic* در سال ۲۰۰۲ همخوانی نداشته است. آنها مشاهده نمودند که کاهش تعداد باکتری‌های آغازگر در نمونه‌های پنیر حاوی ادویه‌های نعناع، *لیمون میرتل*[1] و *باش تومیتو*[2] در مقایسه با نمونه شاهد معنا دار نیست و این ادویه‌ها تاثیری بر کاهش تعداد باکتری نداشتند، درحالیکه در این تحقیق اسانس‌های مورد مطالعه باعث کاهش در لگاریتم تعداد مخمر شدند. که علت این تفاوت در نوع میکروارگانیسم مورد مطالعه می‌باشد چرا که حساسیت میکروارگانیسم‌های مختلف به اسانس‌ها مشابه هم نمی‌باشد. و همچنین بسته به اینکه میکروارگانیسم در چه مرحله‌ای از رشد خود باشد، عکس العمل‌های متفاوتی نسبت به اسانس‌های مختلف از خود نشان می‌دهد.

نتایج آنالیز واریانس حاصل از ارزیابی حسی میانگین امتیاز پذیرش کلی دوغ ایرانی حاوی تیمارهای مختلف اسانس اوجی نشان داد که با افزایش غلظت اسانس امتیاز پذیرش کلی کاهش می‌یابد. تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۱ و همچنین ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵ فاقد اختلاف آماری معنی‌داری بوده اند. تیمارهای شاهد و ۰/۲۵ اسانس اوجی از بیشترین و کمترین امتیاز پذیرش کلی بترتیب برخوردار بوده اند.

در مورد اثر توام اسانس بر خواص ارگانولپتیکی و اثر ضد میکروبی می توان گفت، غلظت بهینه ای که باعث ایجاد طعم مطبوع شد نیز غلظت ۰/۱ درصد اسانس بود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی اثر ضد میکروبی اسانس گیاه اوجی بر مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* در غلظت‌های مختلف به روش دیسک دیفیوژن نشان داد که این اسانس در محیط کشت حاوی مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* هاله شفاف در اطراف دیسک‌ها ایجاد کرد. غلظت خالص دارای بالاترین قطر هاله عدم رشد است و با کمتر شدن غلظت اسانس قطر هاله عدم رشد کمتر می‌شود.

در بررسی اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس اوجی بر روی رشد مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* در

[1] Lemon Myrtle [2] Bush Tomato

دوغ مشخص شد که این اسانس دارای خاصیت بازدارندگی بر روی رشد میکروارگانیسم مورد مطالعه بوده است و با افزایش غلظت اسانس اثر بازدارندگی بر روی رشد مخمر *کلایورومایسس مارکسیانوس* افزایش یافته است. در مورد اثر توام اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی و اثر ضد میکروبی می‌توان گفت، غلظت بهینه‌ای که باعث ایجاد طعم مطبوع شد غلظت ۰/۱ درصد اسانس بود که این غلظت در دمای ۴ درجه باعث کاهش معناداری در لگاریتم تعداد مخمر تلقیحی نیز گردید.

سپاسگزاری

با تشکر از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت اله آملی و کلیه پرسنل و کارکنان آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی که در انجام این تحقیق از مساعدت و همراهی آنان بهره مند شدم.

منابع

بنیادیان، م. و کریم، گ. (۱۳۸۱). مطالعه تأثیر روغن‌های فرار برخی گیاهان بر باکتری‌های *E.coli* و *S.aureus* در محیط کشت مایع. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۷، شماره ۴، صفحات ۳۳-۳۱.

بی‌نام. (۱۳۷۰). ویژگی‌های آب آشامیدنی. استاندارد ملی ایران. شماره ۱۰۵۳.

بی‌نام. (۱۳۸۹). شیرخشک- ویژگی ها. استاندارد ملی ایران، شماره ۲۰۱۲. تجدید نظر چهارم.

جیمز .ام. جی. (۱۳۷۲). میکروبیولوژی غذایی مدرن. مترجم: مرتضوی، ع. حداد خداپرست، م. فرهنوش، ر. ناصحی، ب. و رضائی مکرم، ر. جلد اول، چاپ اول، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات ۵۴-۲۱.

خدائیان چگنی، ف. (۱۳۷۸). میکروبیولوژی مواد غذایی. ویرایش پنجم، مؤسسه آموزش عالی پارسه، صفحات ۲۳۲-۱.

روحانی، ن. (۱۳۹۲). بررسی خواص ضد میکروبی و حسی اسانس کاکوتی کوهی و نعناع فلفلی بر مخمر*کلایورومایسس مارکسیانوس* در دوغ ایرانی. پایان نامه کارشناسی ارشد تکنولوژی مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آیت اله آملی- دانشکده صنایع غذایی و کشاورزی.

زرگری، ع. (۱۳۷۶). گیاهان دارویی، موسسه انتشارات دانشگاه تهران، جلد چهارم، چاپ ششم، صفحات ۱۴۵-۱.

فدائی، س.، آبرومند آذر، پ.، شریفیان، ا. و لاریجانی، ک. (۱۳۸۳). اثر ضد میکروبی اسانس نعناع فلفلی و مقایسه آن با بنزوات سدیم. مجله علوم غذایی و تغذیه، سال هشتم، شماره ۱، صفحات ۴۱-۳۴.

کریمی، ر. (۱۳۸۷). مطالعه اثر ضدمیکروبی اسانس‌های نعناع، پونه، گلاب و تاثیر دمای نگهداری بر روی رشد *Debaryomyces hansenii* در دوغ ایرانی. رساله دکتری رشته بهداشت مواد غذایی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات. دانشکده تخصصی علوم دامپزشکی.

مشتاقی، ح. و بنیادیان، م. (۱۳۸۷). اثرات ضد لیستریایی عصاره روغنی نعناع (*Mentha spicata L.*) در یک مدل غذایی. فصلنامهٔ علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد ۲۴، شماره ۳، ۳۳۲-۳۲۶.

وثوق، ا.ص.، خمیری، م.، کاشانی نژاد، م. و جعفری، م. (۱۳۸۸). اثر عرق نعناع بر قابلیت بقای باکتری های پروبایوتیک در نوشیدنی سنتی ایرانی (دوغ). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۸۵-۷۷

Agboola, S. O. & Tesic, M. R. (2002). Influence of australian native herbs on the maturation of vaccum-packed cheese. Lebensm. –wiss. u.- Technol., 35, 575-582.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A. & Idaomar, M. (2005). Cytotoxicity and gene induction by some essential oils in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res*. 585, 1–13.

Gulluce, M., Shain, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. & Ozcan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. spp. longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449-1456.

Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Ashraf, M. & Gilani, A. H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha species*.

Journal of the Science of Food and Agriculture, 90, 1827–1836.

Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilinc., E. & Yuksel, U. (2010). Mineral content, essential oils components and biological activity of two mentha species (*M. piperita* L., *M. spicata* L.). *Turkish Journal of Field Crops*, 15(2), 148-153.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. & Satya, S. (2011). Insecticidal Properties of Mentha species: A review. Industrial Crops and products. 34, 802-817.

Najafpour Navaei, M. (1979). Medicinal and aromatic plants research. Forest and Pastures Research Institute Publications. pp. 88 -102.

Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N. & Tassou, C. C. (2003). Natural antimicrobials for the minimal processing of food. Vol. 9., in: Antimicrobials from herbs and spices. Cambridge, England. CRC press Woodhead publishing Limited, LLC, pp. 170-200.

Singh, R., Shushni, M. A. M. & Belkheir, A. (2011). Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita L. Arabian Journal of Chemistry*.4. pp. 1-7.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. & Fyfe, L. (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food Microbiology*, 18, 463-470

Sokovic, M. D., Vukojevic, J., Marin, P. D., Brkic, D. D., Vajs, V. & Van Griensven, L. J. L. D. (2009). Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* Species and their antifungal activities. Molecules, 14, 238-249.

Stevens, M. J. A., Vollenweider, S., Meile, L. & Lacroix, C. (2011). 1,3-Propanedioldehydrogenases in lactobacillus reuteri: impact on central metabolism and3-hydroxypropionaldehyde production. Microbial Cell Factories, 10, 61, 1-9.

Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A. & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199–1218.

Tassou, C. (1995). Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4Ċ and 10Ċ. Journal of Applied Bacteriology, 7, 593-600.

Tyagi, A. M. & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. Food Control, 22, 1707-1714.

Youzbashi, M. (1380). Study of Myrtus communis essential oil. Pharm. D. Thesis. Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science.